

ИЗМЕНЧИВОСТЬ СЕВЕРОКАВКАЗСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ ОБЫКНОВЕННОЙ ЗЛАКОВОЙ ТЛИ ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ К РАСТЕНИЯМ-ХОЗЯЕВАМ И МОЛЕКУЛЯРНЫМ МАРКЕРАМ

© 2019 г. Е. Е. Радченко¹ *, Н. В. Алпатьева¹, М. А. Чумаков¹, Р. А. Абдуллаев¹

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений
им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190000 Россия

*e-mail: eugene_radchenko@rambler.ru

Поступила в редакцию 04.04.2019 г.

После доработки 17.05.2019 г.

Принята к публикации 30.05.2019 г.

Изучали закономерности динамики генетической структуры краснодарской и дагестанской популяций обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* Rondani по вирулентности и молекулярным маркерам. Выявлен высокий сезонный полиморфизм двух северокавказских популяций насекомого по частотам вирулентности к образцам сорго, защищенным главными генами устойчивости. Установлено, что эта изменчивость зависит также от генов устойчивости растений со слабым фенотипическим проявлением. В период питания на сорго изменяются и частоты клонов тли, вирулентных к образцам ячменя. При этом отбор клонов на восприимчивом и умеренно устойчивом образцах сорго проходил дифференцированно. С помощью пиросеквенирования полиморфного фрагмента митохондриального гена *ND4* идентифицировали 16 гаплотипов обыкновенной злаковой тли. Показаны неоднородность и различие северокавказских популяций насекомого по соотношению выявленных гаплотипов. В краснодарской популяции *S. graminum* различаются как выборки клонов тли, собранные одновременно на восприимчивом и умеренно устойчивом к фитофагу генотипах сорго, так и собранные в разные периоды вегетации на одном образце растения-хозяина.

Ключевые слова: сорго, ячмень, *Schizaphis graminum*, популяции, вирулентность, митохондриальная ДНК, *ND4*, гаплотипы, отбор.

DOI: 10.1134/S0016675819110122

Обыкновенная злаковая тля *Schizaphis graminum* Rondani — один из основных вредителей зерновых культур в южных регионах России. Насекомое зимует на диких и озимых культивируемых злаках, весной и в начале лета вредит на зерновых колосовых и овсе, а затем массово мигрирует на всходы сорго, которому и причиняет наиболее ощутимый ущерб. В последние годы появились сведения о возрастающей вредоносности фитофага на посевах риса.

Обыкновенной злаковой тле присуще дифференциальное взаимодействие с генотипами растений-хозяев. Возможность приспособления к питающему растению вызывает необходимость изучения изменчивости *S. graminum*, источником которой могут явиться иммиграция вирулентных клонов в локальную популяцию извне, мутационный процесс и комбинативная изменчивость внутри локальной популяции по генам вирулентности. Повсеместно наблюдающаяся генетическая однородность агроценозов способствует ускорению адаптивной микроэволюции насекомого.

Полиморфизм популяций *S. graminum* по вирулентности (т.е. по специфической способности преодолевать действие генов устойчивости хозяина) на территории бывшего СССР впервые выявлен нами в результате изучения устойчивости образцов сорго к ставропольской и узбекской популяциям тли. Была показана относительная изоляция популяций насекомого из европейской части России и Азии (Казахстан, Узбекистан) [1]. Многолетний мониторинг краснодарской популяции *S. graminum* позволил выявить высокую общую и сезонную изменчивость насекомого по вирулентности к шести образцам сорго, несущим различные гены устойчивости, а также по RAPD-маркерам. Ежегодно идентифицировали 22–36 фенотипов вирулентности фитофага. Показали, что под воздействием абиотических факторов может меняться конкурентоспособность клонов насекомого и, следовательно, изменение условий среды приводит к дифференциальному отбору в популяциях *S. graminum*. Наблюдали отбор генотипов *S. graminum*, специфически приспособленных к виду растения-хозяина. При размножении

на ячмене преимущество в конкуренции имели особи, не обладающие “лишними” генами вирулентности к сорго. Смена хозяина приводила и к существенному изменению соотношения близких по профилям RAPD, фрагментов групп генотипов [2, 3].

Представляет интерес выяснить – происходит ли в природных популяциях насекомого отбор фенотипов вирулентности, обусловленный генами устойчивости растения-хозяина со слабым фенотипическим эффектом. Малые гены устойчивости часто выявляют при изучении взаимодействия сорго и *S. graminum* [4]. Кроме того, отсутствуют сведения о закономерностях организации генетической структуры популяций обыкновенной злаковой тли в зависимости от эколого-географических особенностей регионов ее обитания.

Необходимая составляющая подобного рода экспериментов в настоящее время – анализ молекулярного полиморфизма фитофагов. В популяционно-генетических исследованиях членистоногих активно используют методы высокопродуктивного секвенирования как ядерного, так и митохондриального геномов [5, 6]. Одна из задач наших исследований – сравнение популяций тли по нуклеотидным последовательностям полиморфного фрагмента митохондриального, нерекombинирующего, генома.

Цель настоящей работы – характеристика изменчивости популяций *S. graminum*, обитающих в контрастных по климатическим условиям и флористическому разнообразию зонах Северного Кавказа, по вирулентности к растениям-хозяевам и молекулярным маркерам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализировали изменчивость краснодарской (Кубанская опытная станция ВИР – КОС ВИР, Гулькевичский район) и дагестанской (Дагестанская опытная станция ВИР – ДОС ВИР, г. Дербент) популяций *S. graminum*. В течение двух лет (2013–2014 гг.) колонии тли на КОС ВИР собирали дважды за сезон: в июне (активное заселение посевов фитофагом) и в августе (начало спада численности) на восприимчивом образце сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) СЛВ-2, а также на сорте Ефремовское белое, который характеризуется умеренной устойчивостью к тле. В полевых условиях на фоне высокой численности насекомого поврежденность СЛВ-2 составляет не менее 7 баллов (повреждено 36–50% площади листовой поверхности), Ефремовского белого – 5 (21–35%) [7]. На ДОС ВИР, где нет производственных посевов сорго, а на зерновых колосовых культурах насекомые отмечались единично, тлю собирали на диком сорго (*Sorghum halepense* (L.) Pers., гу-май, или Джонсонова трава) в 2013 г. два раза за

сезон, а в 2014 г. вследствие низкой численности – только в июне. Для сбора и транспортировки насекомых использовали компактные садки-контейнеры с проростками пшеницы.

В лаборатории собранные выборки (субпопуляции) тли клонировали. На смоченную водой вату, помещенную в половинки чашек Петри, раскладывали проросшие семена пшеницы сорта Ленинградская 97, затем на всходы в каждой чашке подсаживали одну самку и закрывали стеклянными изоляторами, верхняя часть которых была затянута мельничным газом. Садки с клонами тли размещали на светоустановках, оборудованных люминесцентными лампами [7].

Оценивали поврежденность образцов сорго с идентифицированными генами устойчивости к тле [8, 9]: к-3852, Сарваши (гены устойчивости *Sgr1* + *Sgr2*); к-9921, Shallu (*Sgr3*); к-6694, Deer (*Sgr4*); к-9436, Соргоградское (*Sgr5*); к-1362, Дурра белая (*Sgr5* + *Sgr6*); к-455, Сарбам (*Sgr12*). Всходы заселяли тлями одного клона и при гибели контроля (Низкорослое 81) определяли поврежденность по шкале от 0 до 10 (гибель растений). Растения с баллами 1–4 относили к устойчивым, 9–10 – к восприимчивым. При нечетком проявлении устойчивости эксперимент повторяли. Полиморфизм собранных субпопуляций оценивали по частотам фенотипов, которые идентифицировали с помощью упомянутых образцов, распределенных в две группы: Deer–Сарваши–Сарбам и Shallu–Соргоградское–Дурра белая. В каждой группе в случае авирулентности клона тли (устойчивости сорго) образцу присваивали значение 0. В случае вирулентности насекомого первому образцу присваивали значение 1, второму – 2, третьему – 4. Фенотип вирулентности клона обозначали числом из двух цифр, каждая из которых являлась суммой реакций устойчивости (восприимчивости) дифференциаторов [10].

Аналогичную методику использовали и при изучении полиморфизма *S. graminum* по вирулентности к образцам ячменя, т.е. культуры, которая в июне уже созревает и не является хозяином фитофага в период проведения сборов. При гибели контроля (сорт Белогорский) оценивали устойчивые к ряду идентифицированных в США биотипов тли сорта Post (имеет ген устойчивости *Rsg1*) [11], Herb и Wintermalt, а также выделенные нами [12] образцы ячменя к-16190, к-15600 из Китая и к-28129 (КНДР). Образцы распределили в следующие группы: Post–Herb–Wintermalt и к-16190–к-28129–к-15600.

Для оценки изменчивости и сравнения субпопуляций тли пользовались критериями Л.А. Животовского [13]. Внутрипопуляционное разнообразие оценивали с помощью критерия μ (среднее число фенотипов в популяции) по формуле: $\mu = (\sqrt{p_1} + \sqrt{p_2} + \dots + \sqrt{p_m})^2$, где p_1, p_2, \dots, p_m – вы-

борочные значения частот фенотипов, m – число фенотипов. Определяли также долю редких фенотипов: $h = 1 - \mu/m$. Популяции сравнивали по критерию сходства: $r = \sqrt{p_1q_1} + \sqrt{p_2q_2} + \dots + \sqrt{p_mq_m}$, где p и q – частоты фенотипов в сравниваемых выборках. Значимость различий популяций по частотам общих фенотипов оценивали по критерию идентичности: $I = \frac{8N_1N_2}{N_1 + N_2} \left(1 - r - \frac{p^0 + q^0}{4} \right)$, где p^0 – сумма частот фенотипов первой выборки, не представленных во второй выборке; q^0 – сумма частот фенотипов второй выборки, которые отсутствуют в первой.

Генетические различия между субпопуляциями тли оценивали также с помощью индекса фиксации Райта F_{st} [14], который рассчитывали в программе GenAlEx 6.5 (Genetic analysis in Excel, 6.5 <http://biology.anu.edu.au/GenAlEx>) [15]. Многомерная дендрограмма сходства между субпопуляциями *S. graminum* по вирулентности к 12 упомянутым выше дифференциаторам сорго и ячменя построена с помощью опции Principal Coordinates (PCoA).

Сравнительный молекулярно-генетический анализ популяций *S. graminum* проводили с помощью пиросеквенирования полиморфного фрагмента гена *ND4*, кодирующего четвертую субединицу НАДН-дегидрогеназы, длиной 215 пн. Генотипировали не менее 1000 особей из каждой субпопуляции тли. Суммарную ДНК выделяли по методике, предложенной на сайте molbiol (http://molbiol.ru/protocol/14_04.html). Пиросеквенирование проводили на приборе GS Junior от Roche/454. Праймерами для идентификации последовательности в 215 пн служили олигонуклеотиды F: GAGGGAGGAAAAGATATATTTG и R: GCTTATTCATCTGTTGTTCA, разработанные по аналогии с предложенными ранее F.O. Aikhionbare, Z.B. Mayo [16] для идентификации распространенных в США биотипов *S. graminum*. Всего для 11 субпопуляций насекомого проанализировали более 7000 фрагментов гена *ND4*. Выравнивание и анализ последовательностей проводили с помощью программы MEGA 7 [17]. Редкие сайты, замеченные в которых встречались в одной–двух последовательностях, были исключены из анализа. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поврежденность образцов сорго Deeg и Дурра белая авирулентными клонами обычно составляла 1–2, Shallu – 3 балла. Широкое варьирование степени поврежденности характерно для сортов Sarbam, Сарваши (1–4 балла) и Соргоградское

(2–4 балла). При гибели восприимчивого контроля поврежденность авирулентными клонами тли образцов ячменя составляла 2–3 балла. Вирулентные клоны во всех случаях обуславливали поврежденность растений 8–10 баллов.

Частоты вирулентных к изучаемым образцам сорго клонов тли существенно различались (табл. 1). Так, наиболее устойчивым к обеим популяциям насекомого в 2013 г. был образец Дурра белая, наименее – Deeg, Сарваши и Sarbam. Подавляющее большинство клонов вирулентны к сортам ячменя Wintermalt и Herb, тогда как образец к-16190 на КОС ВИР сильно повреждали лишь 5.3–19.0% клонов тли.

На КОС ВИР в 2013 и 2014 гг. выявили 31 фенотип вирулентности к дифференциаторам сорго (от 4 до 24 в каждой субпопуляции); в Дербенте идентифицировали 17 (2013 г.) и 9 (2014 г.) фенотипов вирулентности (табл. 2). В 2013 г. на Кубани доминировал фенотип вирулентности 73, в дагестанской популяции наблюдали смену доминирующего фенотипа на одном и том же генотипе хозяина. В следующем году отмечена смена доминирующего фенотипа и на КОС ВИР. В двух субпопуляциях довольно высока доля редких фенотипов вирулентности к образцам сорго, остальные субпопуляции достаточно выровнены по частотам фенотипов.

В краснодарской популяции идентифицировали 19 фенотипов вирулентности тли к образцам ячменя в 2013 г. и 22 – в 2014 г.; в дагестанской популяции выявили 16 (2013 г.) и 7 (2014 г.) фенотипов. В изученных субпопуляциях обычно доминировал вирулентный к двум сортам селекции США фенотип вирулентности 60 (табл. 3).

Согласно критерию идентичности существенно различались субпопуляции, собранные на разных генотипах сорго в один и тот же день; значительно различались и субпопуляции, собранные на одном и том же хозяине в разное время (табл. 4). В 2013 г. наблюдали также значимое различие по вирулентности к образцам ячменя субпопуляций, собранных на разных генотипах сорго в один и тот же день. Дагестанские субпопуляции в большинстве случаев существенно ($P < 0.05$) отличались от краснодарских по частотам вирулентности к образцам сорго ($r = 0.43–0.78$) и ячменя ($r = 0.39–0.74$) в 2013 г.

При использовании в качестве дифференциаторов 12 образцов (6 – сорго и 6 – ячменя) различия между субпопуляциями тли существенно возрастают. Так, на ДОС ВИР в июне 2013 г. идентифицировали 20 фенотипов вирулентности (изучено 24 клона тли), в августе – 22 (24 клона); на следующий год каждый из 11 изученных клонов представлял собой уникальный фенотип вирулентности. В двух субпопуляциях 2013 г. выявлен лишь один общий фенотип (7276). Два клона

Таблица 1. Частоты вирулентных к образцам сорго и ячменя клонов *S. graminum*, собранных на Северном Кавказе в 2013 г.

Образец	Частота клонов, вирулентных к образцам сорго и ячменя, %					
	КОС ВИР, сборы на СЛВ-2		КОС ВИР, сборы на Ефремовском белом		ДОС ВИР, сборы на диком сорго	
	июнь	август	июнь	август	июнь	август
Образцы сорго						
Deer	72.0	100	52.0	78.6	79.2	45.8
Сарваши	82.0	100	48.0	80.9	83.3	45.8
Сарбам	74.0	100	44.0	85.7	83.3	41.7
Shallu	86.0	97.3	58.0	88.1	87.5	62.5
Соргоградское	78.0	86.8	68.0	73.8	87.5	58.4
Дурра белая	18.0	36.8	6.0	21.4	29.2	12.5
Образцы ячменя						
Post	36.0	10.5	26.0	45.2	33.3	45.8
Herb	92.0	97.3	100	97.6	75.0	100
Wintermalt	88.0	97.3	94.0	97.6	83.3	100
к-16190	18.0	5.3	18.0	19.0	33.3	58.3
к-28129	30.0	21.1	34.0	23.8	29.2	45.8
к-15600	44.0	36.8	50.0	45.2	25.0	62.5

Таблица 2. Фенотипическое разнообразие субпопуляций *S. graminum* по вирулентности к образцам сорго

Сбор (образец, дата)	Изучено клонов	Число фенотипов	Доминирующий фенотип	Среднее число фенотипов	Доля редких фенотипов
Краснодарская популяция					
Ефремовское, 06.2013	50	19	73	16.21 ± 0.95	0.15 ± 0.05
Ефремовское, 08.2013	42	11	73	8.17 ± 0.74	0.26 ± 0.07
СЛВ-2, 06.2013	50	19	73	14.08 ± 1.18	0.26 ± 0.06
СЛВ-2, 08.2013	38	4	73	3.28 ± 0.25	0.18 ± 0.06
Ефремовское, 06.2014	40	14	73	12.29 ± 0.73	0.12 ± 0.05
Ефремовское, 08.2014	48	24	00	20.82 ± 1.17	0.13 ± 0.07
СЛВ-2, 06.2014	28	13	73	11.11 ± 0.87	0.15 ± 0.07
СЛВ-2, 08.2014	24	8	73, 00	6.73 ± 0.60	0.16 ± 0.07
Дагестанская популяция					
Дикое сорго, 06.2013	24	11	73, 77	8.87 ± 0.89	0.19 ± 0.08
Дикое сорго, 08.2013	24	15	00	13.98 ± 0.77	0.07 ± 0.05
Дикое сорго, 06.2014	11	9	53, 02	8.78 ± 0.41	0.02 ± 0.04

в 2014 г. имели фенотипы вирулентности (0260 и 6360), идентичные фенотипам, выявленным в 2013 г. Таким образом, среди 59 клонов тли из дагестанской популяции выявили 50 фенотипов вирулентности к 12 образцам сорго и ячменя.

На многомерной диаграмме, построенной на основании значений индекса F_{st} , изученные с помощью 12 дифференциаторов субпопуляции кластеризовались в три группы (рис. 1). Ни в одну из

групп не вошла выборка клонов из краснодарской популяции тли, питавшихся на образце СЛВ-2 в 2013 г. Лишь субпопуляции, собранные на сорте Ефремовское белое в 2014 г., оказались сходны между собой. Во всех остальных случаях значительно различались как питавшиеся на одном и том же хозяине в разное время субпопуляции, так и собранные в один и тот же день на разных образцах сорго.

Таблица 3. Фенотипическое разнообразие субпопуляций *S. graminum* по вирулентности к образцам ячменя

Сбор (образец, дата)	Изучено клонов	Число фенотипов	Доминирующий фенотип	Среднее число фенотипов	Доля редких фенотипов
Краснодарская популяция					
Ефремовское, 06.2013	50	15	60	12.32 ± 0.81	0.18 ± 0.05
Ефремовское, 08.2013	42	10	60	8.40 ± 0.57	0.16 ± 0.06
СЛВ-2, 06.2013	50	14	60	11.89 ± 0.71	0.15 ± 0.05
СЛВ-2, 08.2013	38	9	60	6.82 ± 0.63	0.24 ± 0.07
Ефремовское, 06.2014	40	16	77	13.19 ± 0.96	0.18 ± 0.06
Ефремовское, 08.2014	48	14	70	12.30 ± 0.66	0.12 ± 0.05
СЛВ-2, 06.2014	28	10	60	8.50 ± 0.67	0.15 ± 0.06
СЛВ-2, 08.2014	24	10	00	9.08 ± 0.59	0.09 ± 0.06
Дагестанская популяция					
Дикое сорго, 06.2013	24	12	60	10.47 ± 0.82	0.13 ± 0.07
Дикое сорго, 08.2013	24	10	77	9.64 ± 0.38	0.04 ± 0.03
Дикое сорго, 06.2014	11	7	60	6.44 ± 0.57	0.08 ± 0.08

Таблица 4. Критерии сходства (*r*) и идентичности (*I*) для субпопуляций *S. graminum*

Сравниваемые субпопуляции тли		Степень сходства			
		по генам вирулентности к образцам сорго		по генам вирулентности к образцам ячменя	
		<i>r</i>	<i>I</i>	<i>r</i>	<i>I</i>
2013 г.	Ефремовское, июнь–август	0.64	37.62*	0.81	21.73
	СЛВ-2, июнь–август	0.77	22.66	0.81	19.86
	Ефремовское, июнь – СЛВ-2, июнь	0.63	49.82**	0.75	35.0**
	Ефремовское, август – СЛВ-2, август	0.81	17.01	0.73	26.49*
	Дикое сорго, июнь–август	0.66	23.24	0.58	23.04
2014 г.	Ефремовское, июнь–август	0.74	28.36	0.73	27.95
	СЛВ-2, июнь–август	0.69	17.24	0.77	15.64
	Ефремовское, июнь – СЛВ-2, июнь	0.56	32.88*	0.71	23.09
	Ефремовское, август – СЛВ-2, август	0.59	32.14	0.79	15.71

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

С помощью пиросеквенирования фрагмента гена *ND4* обнаружили три преобладающих во всех субпопуляциях типа последовательностей, обозначенных нами I, II и III (рис. 2), которые различаются строением триплета, кодирующего 323-ю аминокислоту лейцин в предполагаемой белковой последовательности фермента: для I гаплотипа – TTG, для II – CTG и для III – TTA. Кроме того, гаплотип III отличается от двух других строением триплета, кодирующего 299-ю аминокислоту глицин (GGG – для I и II гаплотипов, GGT – для III). Внутри каждой группы детектировали гаплотипы, различия между которыми связаны с восемью синонимическими и тремя смысловыми

заменами. Всего обнаружено 16 вариантов последовательностей, обозначенных Ia–Ig, IIa–IIe, IIIa–IIIд.

Краснодарская популяция насекомого отличается от дагестанской, прежде всего, по содержанию митохондриальных гаплотипов Ia и IIb (табл. 5). Так, в восьми собранных на КОС ВИР субпопуляциях тли доля гаплотипа Ia варьирует от 11.1 до 31.8%, а в трех выборках собранных на ДОС ВИР – от 31.1 до 58.2%; доля гаплотипа IIb на посевах сорго КОС ВИР составляет 7–27.2%, на ДОС ВИР – 1.7–5.8%. Только на КОС ВИР найдены редкие гаплотипы Ib, Ie, Ig, IIд, IIe, IIIc, IIIд (0.3–4.0% в субпопуляциях, собранных на

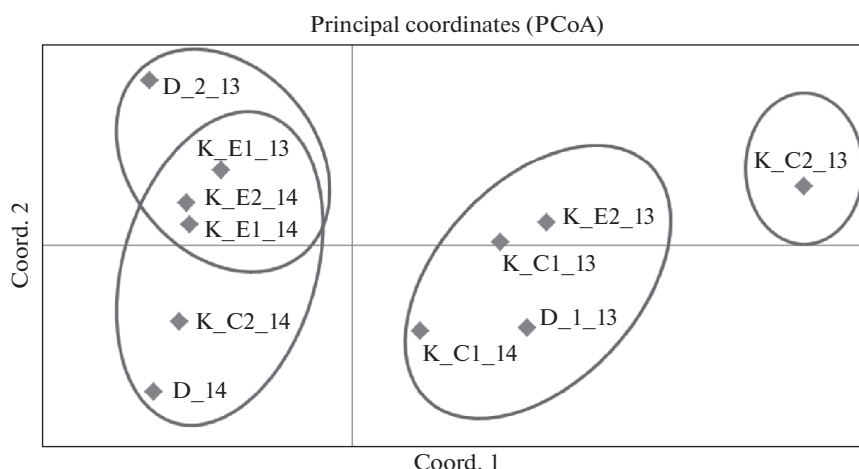


Рис. 1. Многомерная диаграмма генетического сходства по вирулентности между субпопуляциями *S. graminum* по индексу F_{st} . D_1_13, D_2_13, D_14 – дагестанские субпопуляции, собранные на диком сорго; K_E1_13, K_E2_13, K_E1_14, K_E2_14 – краснодарские субпопуляции, собранные на образце сорго Ефремовское белое; K_C1_13, K_C2_13, K_C1_14, K_C2_14 – краснодарские субпопуляции, собранные на образце сорго СЛВ-2.

S. bicolor); уникальные гаплотипы на *S. halepense* не выявлены.

В субпопуляциях, собранных на восприимчивом сорте СЛВ-2, соотношение основных митохондриальных гаплотипов заметно варьировало в период вегетации растения-хозяина: в августе 2013 г. возросла доля гаплотипа Ia и уменьшилась встречаемость IIa и IIIb; в 2014 г., напротив, в 2 раза уменьшилась доля гаплотипа Ia, несколько снизилась частота гаплотипа IIa, а доля IIIb увеличилась в 3 раза. Состав субпопуляции, собранной в августе на относительно устойчивом сорте Ефремовское белое, менялся незначительно: на 2.7–3.1% уменьшалась доля гаплотипа Ia и на

3–13.2% увеличивалась доля IIa, на 1–1.8% уменьшилась доля гаплотипа IIIb в 2013 г. и 2014 г. соответственно. Некоторые редкие гаплотипы (Ic, IIc), обнаруживаемые ежегодно на Ефремовском белом в начале сезона, в августовских сборах не выявлены. В дагестанской популяции 2013 г. на диком сорго, наряду с уменьшением доли главных митохондриальных гаплотипов, выявлены новые (Ic, If и IIc), суммарная доля которых в июле составила около 20%.

В субпопуляциях, собранных на образцах СЛВ-2 и Ефремовское белое в начале вегетации, соотношение главных гаплотипов почти идентично, однако в августе популяции уже значимо

Таблица 5. Содержание (%) митохондриальных гаплотипов в субпопуляциях *S. graminum*

Образец, сформировавший субпопуляцию	Дата сбора	Митохондриальный гаплотип															
		Ia	Ib	Ic	Id	Ie	If	Ig	IIa	IIb	IIc	IIId	IIe	IIIa	IIIb	IIIc	IIId
СЛВ-2	06.2013	17.1	0	0.4	0.8	0	0.2	0	63.5	1.1	1.5	0	0	1.6	13.8	0	0
	08.2013	31.4	0	0.3	0.7	0	0.2	0	57.0	1.3	0	0	0	2.1	7.0	0	0
	06.2014	25.7	0	0.6	0.2	0	0	0.7	58.5	1.0	0	0	0	1.5	9.1	2.0	0.7
	08.2014	12.6	0	2.0	1.0	0	0	0	45.2	4.0	0	0	4.0	4.0	27.2	0	0
Ефремовское белое	06.2013	14.2	0	0.3	1.0	0	0	0	60.4	1.8	0.6	1.0	0	3.0	17.7	0	0
	08.2013	11.1	2.7	0	0.4	0.3	0	0	63.4	1.9	0	0	0	3.5	16.7	0	0
	06.2014	31.8	0	0.2	0	0	0.2	0	48.4	0.6	4.5	0	2.0	1.5	10.8	0	0
	08.2014	29.1	0	0	0.2	0	0	0	61.6	0	0	0	0	0.1	9.0	0	0
Дикое сорго	06.2013	40.7	0	0	0	0	0	0	55.4	0	0	0	0	1.2	2.7	0	0
	08.2013	31.1	0	1.9	0	0	1.7	0	47.2	0	15.9	0	0	0.5	1.7	0	0
	06.2014	58.2	0	4.8	1.0	0	0.3	0	28.7	0.6	0	0	0	0.6	5.8	0	0

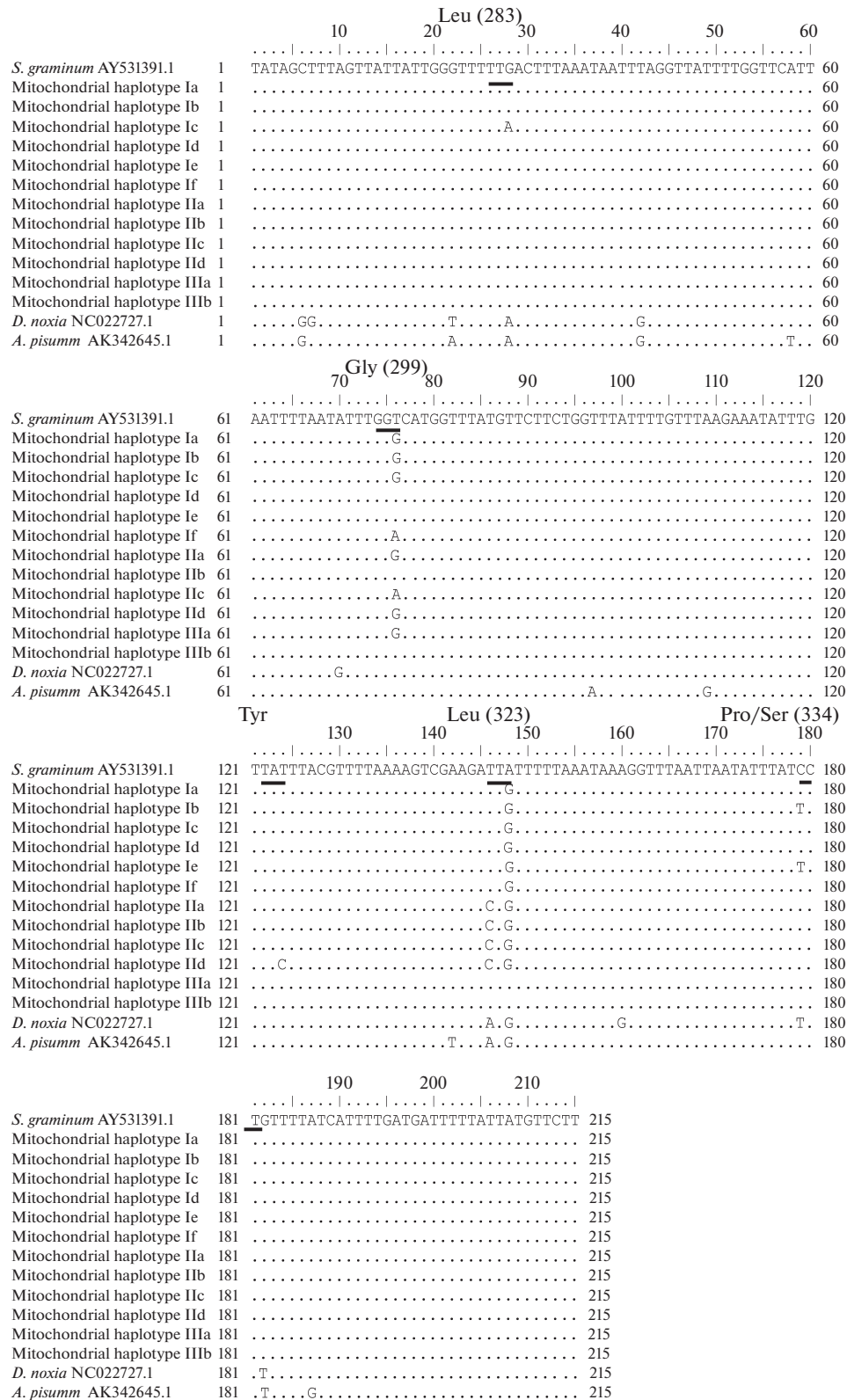


Рис. 2. Выравнивание основных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *ND4*, выявленных в субпопуляциях *S. graminum*. Подчеркнуты триплеты, в которых найдены нуклеотидные замены, и указаны соответствующие им аминокислоты (в скобках обозначены их позиции в предполагаемой полной последовательности белка). В качестве контрольных приведены сиквенсы *S. graminum* (AY531391.1), ячменной (русской пшеничной) тли *Diuraphis noxia* Kurdjumov (NC022727.1) и гороховой тли *Acyrtosiphon pisum* Harris (AK342645.1) из системы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

отличаются друг от друга. Обнаружены и уникальные последовательности: только в субпопуляциях, собранных на СЛВ-2, найдены гаплотипы Ig, IIIc и III d, на Ефремовском белом – гаплотипы Ib, Ie, Id (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

С целью изучения влияния эколого-географических особенностей регионов обитания тли на структуру популяций *S. graminum* сбор насекомых проводили в существенно различающихся по климатическим условиям и флористическому разнообразию зонах Европейской части России: Дагестане (теплый климат, орошаемое земледелие, высокая влажность воздуха вследствие искусственного орошения и близости моря, очаговые посевы злаковых, низкая численность на них фитофага) и Краснодарском крае (теплый и крайне изменчивый по увлажнению климат, широкое возделывание озимых зерновых культур, ежегодное массовое размножение обыкновенной злаковой тли).

Мониторинг краснодарской популяции тли, как и ранее [2, 3], продемонстрировал возможность радикального изменения генетической структуры популяций обыкновенной злаковой тли в период вегетации хозяина. Выявлена сезонная изменчивость *S. graminum* по частотам клонов, вирулентных к сортам-дифференциаторам сорго, защищенным главными *Sgr*-генами. Показано также, что на сорте Ефремовское белое, который имеет гены устойчивости со слабым фенотипическим проявлением, и на восприимчивом образце СЛВ-2 формировались разные популяции тли. Установлено, что в период питания на сорго изменяются и частоты клонов тли, вирулентных к образцам ячменя. При этом отбор клонов на образцах СЛВ-2 и Ефремовское белое также проходил дифференцированно.

Следует также отметить достаточно отчетливую тенденцию снижения в течение полевого сезона числа фенотипов вирулентности, выявляемых прежде всего в субпопуляциях, питавшихся на восприимчивом образце сорго СЛВ-2.

Образцы сорго, на которых собирали тлю, не имеют *Sgr*-генов сортов-дифференциаторов. Тем не менее наблюдали повышение частот клонов, вирулентных к образцам с этими генами, наиболее отчетливо выраженное при питании фитофага в 2013 г. на восприимчивом сорте СЛВ-2. Отбор тли по вирулентности к сортам ячменя на КОС ВИР не был очевиден. В Дагестане на диком сорго к концу сезона вегетации частоты клонов, вирулентных к образцам сорго с идентифицированными генами устойчивости, напротив, существенно снизились, а к образцам ячменя заметно возросли.

Многочисленные исследования о влиянии генов вирулентности на приспособленность фито-

патогенных грибов привели к противоречивым результатам: не требующиеся для поражения коммерческих сортов “лишние” гены вирулентности либо нейтральны, либо снижают конкурентоспособность патогенов, либо ее повышают [18, 19]. В наших экспериментах с краснодарской популяцией *S. graminum* комплементарные генам устойчивости сортов-дифференциаторов “лишние” гены вирулентности насекомого повышали конкурентоспособность фитофага на сорго. В Дагестане при питании на диком сорго клоны тли с широким спектром вирулентности к *Sgr*-генам вытеснялись из популяции и накапливались клоны с “лишней” вирулентностью к генам устойчивости ячменя.

С помощью пиросеквенирования анализировали фрагмент митохондриального гена *ND4*, нуклеотидный полиморфизм которого ранее был использован F.O. Aikhionbare, Z.B. Mayo [16] при сравнительном анализе популяций *S. graminum*. Пиросеквенирование позволяет одновременно определить тысячи нуклеотидных последовательностей ДНК в индивидуальных реакциях и выявить как основные, так и минорные гаплотипы в популяциях, а также количественно оценить их соотношение. Мы выявили неоднородность и различие двух популяций обыкновенной злаковой тли по нуклеотидным последовательностям фрагмента митохондриального генома. Показано также, что в краснодарской популяции *S. graminum* различаются как выборки клонов тли, собранные одновременно на восприимчивом и умеренно устойчивом к фитофагу генотипах сорго, так и собранные в разные периоды вегетации на одном образце растения-хозяина. Наиболее явственную динамику изменчивости популяции вредителя наблюдали на восприимчивом образце СЛВ-2.

Несколько неожиданно очень высокой оказалась изменчивость популяции *S. graminum* в Дагестане, где зерновые культуры занимают сравнительно небольшие площади, большая часть злаковой сорной растительности вследствие высоких температур обычно “выгорает” в первой половине лета, а численность фитофага на полях, как правило, очень мала. *Sorghum halepense* – засухоустойчивый многолетний длительно вегетирующий злак, на котором тля питается постоянно. Высокую сезонную изменчивость насекомого на этом сорняке можно объяснить селективным влиянием абиотических факторов [3]. Очевидно, фенотипы вирулентности (биотипы) тли в Дагестане формируются только при питании на диком злаке. О важной роли диких растений-хозяев в эволюции *S. graminum*, в том числе и в появлении биотипов со специфической вирулентностью к возделываемым злакам, указывалось ранее [20, 21].

Необходимо отметить, что нами выявлены различия собранных на КОС ВИР и ДОС ВИР популяций тли и по частотам генов вирулентности к образцам овса [22]. Результаты экспериментов свидетельствуют об относительной изолированности дагестанской и краснодарской популяций насекомого. В практическом отношении это означает, что на Кубани и в Дагестане можно выращивать сорта зерновых культур, защищенные тождественными генами устойчивости к вредным организмам.

Работа выполнена в рамках государственного задания ВИР (бюджетный проект № 0662-2019-0006).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Радченко Е.Е. Генетика устойчивости зерновых культур к тлям и проблемы селекции // Генетика. 1994. Т. 30. № 10. С. 1374–1380.
2. Radchenko E.E., Kuznetsova T.L., Alpat'eva N.V. Dynamics of the genetic structure of the Krasnodar greenbug population under host plant alteration // Rus. J. Genetics: Appl. Res. 2012. V. 2. № 6. P. 473–479. <https://doi.org/10.1134/S2079059712060111>
3. Radchenko E.E., Kuznetsova T.L., Zubov A.A. Long-term seasonal polymorphism of the Krasnodar greenbug population for virulence to sorghum varieties carrying different resistance genes // Rus. J. Ecology. 2012. V. 43. № 3. P. 204–209. <https://doi.org/10.1134/S1067413612030137>
4. Радченко Е.Е., Одинова И.Г., Власова Т.В. Наследование признака слабо выраженной устойчивости сорго к обыкновенной злаковой тле // Генетика. 2001. Т. 37. № 10. С. 1364–1370.
5. Cameron S.L. Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny // Ann. Rev. Entomol. 2014. V. 59. № 1. P. 95–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162007>
6. Toju H., Baba Y.G. DNA metabarcoding of spiders, insects, and springtails for exploring potential linkage between above- and below-ground food webs // Zool. Letters. 2018. V. 4. Article 4. <https://doi.org/10.1186/s40851-018-0088-9>
7. Радченко Е.Е. Злаковые тли // Изучение генетических ресурсов зерновых культур по устойчивости к вредным организмам. Методическое пособие. М.: Россельхозакадемия, 2008. С. 214–257.
8. Радченко Е.Е. Идентификация генов устойчивости сорго к обыкновенной злаковой тле // Генетика. 2000. Т. 36. № 4. С. 510–519.
9. Радченко Е.Е. Наследование устойчивости образцов зернового сорго и суданской травы к обыкновенной злаковой тле // Генетика. 2006. Т. 42. № 1. С. 65–70.
10. Михайлова Л.А., Тырышкин Л.Г. Популяции возбудителя бурой ржавчины пшеницы // Успехи современной генетики. 1994. Вып. 19. С. 81–95.
11. Porter D.R., Burd J.D., Mornhinweg D.W. Differentiating greenbug resistance genes in barley // Euphytica. 2007. V. 153. № 1–2. P. 11–14. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9193-5>
12. Radchenko E.E., Kuznetsova T.L., Zveinek I.A., Kovaleva O.N. Greenbug resistance in barley accessions from East and South Asia // Russ. Agric. Sci. 2014. V. 40. № 2. P. 117–120. <https://doi.org/10.3103/S1068367414020177>
13. Животовский Л.А. Показатели популяционной изменчивости по полиморфным признакам // Фенетика популяций. М.: Наука, 1982. С. 38–44.
14. Giraud T., Enjalbert J., Fournier E. et al. Population genetics of fungal diseases of plants // Parasite. 2008. V. 15. № 3. P. 449–454. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153449>
15. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 19. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
16. Aikhionbare F.O., Mayo Z.B. Mitochondrial DNA sequences of greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes // Biomol. Engineering. 2000. V. 16. № 6. P. 199–205. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(99\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(99)00054-4)
17. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
18. Дьяков Ю.Т. Популяционная биология фитопатогенных грибов. М.: Муравей, 1998. 382 с.
19. Дьяков Ю.Т., Левитин М.М. Инвазии фитопатогенных грибов. М.: Ленанд, 2018. 260 с.
20. Porter D.R., Burd J.D., Shufran K.A. et al. Greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes: selected by resistant cultivars or preadapted opportunists? // J. Econ. Entomol. 1997. V. 90. № 5. P. 1055–1065. <https://doi.org/10.1093/jee/90.5.1055>
21. Anstead J.A., Burd J.D., Shufran K.A. Over-summering and biotypic diversity of *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) populations on noncultivated grass hosts // Environ. Entomol. 2003. V. 32. № 3. P. 662–667. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.3.662>
22. Radchenko E.E., Kuznetsova T.L., Chumakov M.A., Loskutov I.G. Greenbug (*Schizaphis graminum*) resistance in oat (*Avena* spp.) landraces from Asia // Genet. Resour. Crop Evol. 2018. V. 65. № 2. P. 571–576. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0554-9>

Variability of the North Caucasus Populations of Greenbug for the Virulence to Host Plants and by the Molecular Markers

E. E. Radchenko^{a, *}, N. V. Alpatieva^a, M. A. Chumakov^a, and R. A. Abdullaev^a

^aFederal Research Center Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, 190000 Russia

*e-mail: eugene_radchenko@rambler.ru

The dynamics of genetic structure of the Krasnodar and Dagestan greenbug *Schizaphis graminum* Rondani populations for the virulence to host plants and with the use of molecular markers was studied. A seasonal variability of two North Caucasus populations of the insect for virulence frequencies to sorghum accessions protected by the main resistance genes was revealed. It has been established that this variability also depends on plant resistance genes with a weak phenotypic manifestation. During the period of feeding on sorghum the frequencies of greenbug clones that are virulent to barley accessions also change. In this case the selection of clones on susceptible and moderately resistant sorghum accessions passed differentially. With the use of pyrosequencing of a polymorphic fragment of the mitochondrial gene *ND4* the 16 haplotypes of greenbug were identified. The non-homogeneity and difference of North Caucasus insect populations for the ratio of identified haplotypes were shown. In the Krasnodar population of *S. graminum* the aphid clone samples differ which were collected as at a time on susceptible and moderately resistant to phytophage sorghum genotypes as during different periods of vegetation on the same accession of the host plant.

Keywords: sorghum, barley, *Schizaphis graminum*, populations, virulence, mitochondrial DNA, *ND4*, haplotypes, selection.